

Гликозилирование гомолога ингибитора пептидазы Куница табака является необходимым условием проявления его способности «открывать» плазмодесмы.

Научный руководитель – Дорохов Юрий Леонидович

Гавриш Глеб Евгеньевич

Студент (специалист)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: gavrishglebevg@gmail.com

Изучение гликопротеинов является важным направлением в современной науке, поскольку ведет к лучшему пониманию работы клетки, но помимо этого открывает новые инструменты, например, для наработки полезных белков в растении. Ранее мы выделили из *Nicotiana benthamiana* ген, имеющий гомологию с генами, кодирующими ингибитор пептидаз Куница (*NbKPILP*). Однако в отличие от известных пептидаз исследуемый нами *NbKPILP* потерял способность ингибировать сериновые пептидазы. Мы доказали, что *NbKPILP* приобрел способность влиять на межклеточный транспорт макромолекул, обеспечивая защиту растения. При детекции нативной формы *NbKPILP* методом Вестерн-блоттинга мы наблюдали несколько форм белка, молекулярный вес которых отличен от ожидаемого, что говорит о наличии модификаций белка. Биоинформатический анализ аминокислотной последовательности выявил четыре сайта N-гликозилирования по аспарагину, и мы предположили, что исследуемый нами белок является гликопротеином. Были созданы генетические конструкции на основе *NbKPILP*, у которых аспарагин в положении 60 и 86 был заменен на аланин, а для аспарагина 136 был заменен контекст на неблагоприятный для N-гликозилирования. Полученными конструкциями заражали листья *N. benthamiana* методом агроинфильтрации. На третий день после инфильтрации собирали пробы и выделяли белок по стандартной методике фракционирования. Полученные белки обрабатывали PNGase (амидаза, режущая связь между N-ацетилглюкозамин и аспарагином - место присоединения олигосахаридного остова), белок разделяли методом электрофореза в денатурирующих условиях и визуализировали методом Вестерн-блоттинга. После обработки PNGase как нативной формы белка, так и его N-мутантных форм, мы детектировали белок, по массе приближенный к положительному контролю (рекомбинантный гистидинилированный *NbKPILP*). Для проверки влияния гликомодификаций на транспортную функцию *NbKPILP* мы проводили тест с использованием реперной молекулы 2xGFP (Мол. масса 54 кДа), межклеточный транспорт которой стимулирует нативная форма *NbKPILP*, способствуя увеличению пропускной способности плазмодесм, которые в норме не способны пропускать молекулы размером более 40 кДа. Заражая ткани листа агробактерией, несущей 35S-2xGFP и агробактерией с различными N-мутантными формами *NbKPILP*, мы наблюдали существенное снижение транспортной функции *NbKPILP* с мутациями в сайтах гликозилирования, сравнимое с отрицательным контролем. В случае нативного варианта *NbKPILP* мы зафиксировали увеличение распространения реперной молекулы в 2,5 раза по сравнению с N-мутантами и отрицательным контролем. Мы заключили, что *NbKPILP* является гликопротеином, для которого N-гликозилирование является важной функциональной модификацией для стимулирования межклеточного транспорта макромолекул.